

文章编号: 1000-0615(2016)08-1195-08

DOI: 10.11964/jfc.20151010108

卵胎生许氏平鲷胚胎离体培养及发育形态学

赵吉, 冯启超, 温海深*

(中国海洋大学水产学院, 山东青岛 266003)

摘要: 为了探讨许氏平鲷的离体培养发育形态学并设计出最适的体外培养液, 以海水生理盐水为主要配方, 设为对照(第一组), 分别加入1%许氏平鲷血清(第二组), 1%许氏平鲷卵巢组织匀浆(第三组), 1%胎牛血清(第四组), 1%许氏平鲷血清+1%许氏平鲷卵巢组织匀浆(第五组), 共形成5组不同的离体培养液。分2次从妊娠许氏平鲷卵巢中获得处于不同发育阶段的胚胎, 分别为高囊胚期、晶体出现期, 在上述5种不同的培养液中培养, 观察记录发育状况。结果发现, 胚胎在体外培养的初始阶段为高囊胚期时, 虽然在5组培养液中都能发育到十六肌节期, 但是每组的发育时序有很大差别, 第五组发育状况最好, 发育最快, 为60 h。第四组发育最慢, 为67 h。其余组的发育时间介于第四组和第五组之间; 当初始阶段为晶体出现期时, 第五组中的胚胎发育速率最快, 为57 h, 并且有最高的孵化率, 为80%。第二组虽然有很快的发育速率, 但其孵化率最低, 为40%。研究表明, 在体外培养条件下, 许氏平鲷的受精卵发育至破膜时约200 h, 且第五组(1%许氏平鲷血清+1%许氏平鲷卵巢组织匀浆)是使许氏平鲷胚胎离体发育最快的培养液。

关键词: 许氏平鲷; 胚胎发育; 离体培养液; 体外培养

中图分类号: S 965.3

文献标志码: A

许氏平鲷(*Sebastes schlegeli*)隶属于鲷形目(Scorpaeniformes)、鲷科(Scorpaenidae)、平鲷属(*Sebastes*)^[1], 曾用名黑鲷。平鲷属鱼类广泛分布于西北太平洋近岸的冷温水域, 在我国主要分布于渤海、黄海和东海海域, 国外主要分布于日本北海道以南以及鄂霍次克海南部海域, 朝鲜半岛东西两岸也大量分布^[2]。许氏平鲷以其肉质鲜美、营养价值高, 生长速率快, 抗病抗寒能力强, 食性广, 能够在自然海区越冬及养殖方式简便多样等优点, 成为近年来最受北方沿海海水养殖业者关注的经济鱼种之一^[3]。

许氏平鲷与海水硬骨鱼类主要的卵生生殖方式不同, 其生殖方式为卵胎生^[4], 即受精卵的结合、胚胎发育以及破膜后一段时间的仔鱼发育都是在母体的卵巢中进行。并且许氏平鲷雌雄鱼的性成熟时间不同, 交配期与繁殖期相隔数月^[5],

这种独特的生殖方式必然在其内部有着相应的生理生化条件作为基础。近年来关于许氏平鲷繁殖生理机制的研究日益增多^[5-9], 但是关于胚胎离体培养的系统研究鲜有报道。

体外全胚胎培养技术(whole embryo culture, WEC)是一种将动物的完整胚胎移植到体外进行培养的实验技术, 主要用于研究早期器官的生长发育和化学物质的胚胎毒性及造成胚胎毒性的机制等^[10]。目前, 关于WEC的研究报道主要集中于哺乳动物, 而对于鱼类WEC的研究很少, 这也与生殖方式属于胎生和卵胎生的鱼类种类少有一定的关系。截止到目前, 只有食蚊鱼(*Gambusia affinis*), 孔雀花鱗(*Poecilia reticulata*), 褐菖鲈(*Sebastes marmoratus*)等几种卵胎生鱼类进行过WEC的研究^[11-14], 而对许氏平鲷的WEC研究还未见报道。

收稿日期: 2015-10-12 修回日期: 2016-05-11

资助项目: 国家自然科学基金(41476110)

通信作者: 温海深, E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

本研究在优化设计培养液的基础上,选取处于不同发育阶段的许氏平鲈胚胎来进行体外培养,主要目的在于能够较全面地探索处于妊娠期的胚胎发育形态学,并求证许氏平鲈胚胎在体外培养成功的可能性;探讨许氏平鲈胚胎体外培养的最佳培养液,为以后的许氏平鲈WEC提供实验基础,为实现许氏平鲈全人工繁殖提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象

2014年4—5月,分若干次从青岛周边采集网箱养殖的形体完整、健康无病、色泽正常的许氏平鲈雌鱼。此时青岛周边海域的温度为12~17℃。实验前将许氏平鲈雌鱼放入预先注入海水的养殖水箱中,盐度为32,水箱规格为长52 cm,宽37 cm,高30 cm。加入麻醉剂MS-222(20 mg/L),静置10~15 min,待鱼体静止不动,用手触碰鱼头部反应迟钝,或用手抓鱼不会逃避时将鱼取出。测量体质量、体长、净重、性腺重等生物学指标,并计算性腺成熟系数。选择卵巢发育成熟且卵细胞已受精的雌鱼作为离体培养实验材料,共计13尾,其生物学指标和性腺成熟系数见表1。

表1 许氏平鲈雌鱼的生物学指标和性腺指数

Tab. 1 Biological indicators and gonad index of female *S. schlegelii*

日期 date	体质量/g body weight	体长/cm body length	净重/g net weight	性腺重/g gonad weight	性腺成熟系数/% gonadosomatic index
4.15	878.0	32.5	646.6	139.8	21.62
4.18	880.3	33.0	660.7	151.9	22.99
4.19	653.4	25.0	515.6	65.4	12.68
4.24	814.2	30.6	629.8	85.6	13.59
4.24	683.4	28.2	539.3	66.9	12.40
4.24	871.0	31.8	630.4	145.6	23.09
4.3	785.3	32.0	564.7	98.7	17.47
5.5	808.7	31.0	635.5	84.7	13.32
5.5	769.3	30.0	679.8	76.2	11.21
5.9	752.6	30.0	556.4	100.1	17.99
5.14	742.8	32.0	586.2	69.6	11.87
5.14	816.3	30.5	655.1	68.0	10.38
5.20	783.2	32.0	614.4	74.8	12.17
平均 mean	787.6	30.7	608.8	94.4	15.44

注:性腺成熟系数(%)=性腺重/净重×100

Notes: gonadosomatic index(%)= gonad weight/net weight×100

1.2 离体培养液的不同成分

由于卵胎生鱼类的受精卵及胚胎在母体的卵巢内发育,被鱼体的体液即生理盐水所浸润,所以本实验选择以海水硬骨鱼类生理盐水作为离体培养液的主要配方^[15](表2)。实验试剂称量后溶于500 mL蒸馏水中,用1 mol/L的HCl调节pH至7.4~7.8。

表2 海水硬骨鱼类生理盐水配方

Tab. 2 Formulation of physiological saline of marine teleost

试剂 reagents	重量/剂量 weight/dose
NaCl	6.750 g
KCl	0.300 g
NaHCO ₃	0.100 g
NaH ₂ PO ₄	0.170 g
CaCl ₂	0.125 g
MgCl ₂	0.175 g
Tris	4.800 g
葡萄糖 glucose	0.500 g
青-链霉素 penicillin-streptomycin	50 000 U

许氏平鲈血清制备 选取形体正常、健康无伤的许氏平鲈雌鱼数尾,先使用MS-222对其麻醉数分钟,然后使用1 mL规格的医用注射器尾静脉抽取新鲜血液。将获得的新鲜血液放于4℃冰箱中静置6 h,然后在12 000 r/min下常温离心10 min,取上清液获得许氏平鲈血清,置于4℃冰箱中保存备用。

许氏平鲈卵巢组织匀浆制备 解剖获得雌性许氏平鲈发育至V期的卵巢,以磷酸缓冲液(PBS)与无水乙醇1:1混合作为匀浆缓冲液,以1 g卵巢:1 mL匀浆缓冲液(W/V)制作许氏平鲈卵巢组织匀浆。将制得的匀浆以12 000 r/min常温离心10 min,取上清液,置于4℃冰箱保存备用。PBS缓冲液的配制方法:称取8.500 g NaCl, 7.055 g Na₂HPO₄·12H₂O, 0.520 g NaH₂PO₄·2H₂O溶于1000 mL蒸馏水中,并用1 mol/L的盐酸调pH至7.2。胎牛血清为Hyclone南美胎牛血清(SV30087)。

1.3 5种不同培养液的设计

实验采用了5种离体培养液:①海水硬骨鱼类生理盐水;②海水硬骨鱼类生理盐水+1%许氏

平鲷血清;③海水硬骨鱼类生理盐水+1%许氏平鲷卵巢组织匀浆;④海水硬骨鱼类生理盐水+1%胎牛血清;⑤海水硬骨鱼类生理盐水+1%许氏平鲷血清+1%许氏平鲷卵巢组织匀浆。5组离体培养液均配制500 mL,置于1000 mL烧杯中,用1 mol/L的盐酸调节pH至7.4。4月18日获取处于高囊胚期的胚胎,4月19日获得处于晶体出现期的胚胎,分别放入这5种不同的培养液进行培养。

1.4 培养方法

将获得的胚胎分别放入盛有500 mL培养液的烧杯中,每个烧杯放200~300个,充气培养。同时进行光温控制,水温控制在15~16 °C,并同时利用空调保证培养室气温不会发生剧烈变化。利用灯光控制受精卵以及胚胎表面的光照(16L:8D),24 h不间断充气,每隔24 h更换1/2的离体培养液,每隔12 h测定每组离体培养液的pH和盐度。

1.5 观察记录

解剖雌鱼,观察卵巢的发育情况,取数个卵细胞置于载玻片上,用Nikon双目显微镜及体视显微镜观察其是否已受精及处于哪个发育阶段。在胚胎进行充气体外培养后,初期每隔20~60 min取样1次,后期每2 h取样1次,取样时采集数十枚受精卵或胚胎置于显微镜下,对受精卵和胚胎的发育过程进行连续的观察和拍摄记录,根据发育情况归纳和判定胚胎发育的时序,并且对各发育时期的形态变化特征进行分析和总结。通过比较同一起来源的受精卵和胚胎在5种培养液中的发育情况,判断得到许氏平鲷胚胎离体培养的最佳培养液。

2 结果

2.1 许氏平鲷胚胎的发育时序及发育特征

许氏平鲷受精卵为含有油球的沉性卵,圆球状,浅黄色或米黄色,透明度较差。平均卵径为(1.14±0.01) mm。在水温15~16 °C,盐度22~26, pH 7.4,体外培养条件下许氏平鲷受精卵发育至破膜的累加全程大约需要10 d。由于许氏平鲷雌鱼和雄鱼成熟时间不同,每年11月份雄鱼性腺成熟后与雌鱼交配,精子储存在雌鱼体内,待来年4—5月雌鱼卵巢成熟后受精^[5],所以准确采集到正处于受精节点上的受精卵难度很

大,经多次实验采集的受精卵最早节点为32细胞期。获得的许氏平鲷胚胎的体外发育时序见表3,胚胎发育特征见文后图版。

2.2 最适体外培养液研究结果

初始胚胎处于高囊胚期的培养结果 培养开始60多个小时后,各组胚胎全部死亡,均发育至十六肌节期,各个离体培养组胚胎的发育时序见表4。从离体培养实验中胚胎的发育情况可以得出,第五组(海水硬骨鱼类生理盐水+1%许氏平鲷血清+1%许氏平鲷卵巢组织匀浆)的胚胎发育状态良好,生长速率最快,为60 h。第一组(海水硬骨鱼类生理盐水)和第三组(海水硬骨鱼类生理盐水+1%许氏平鲷卵巢组织匀浆)次之,为62 h。第四组(海水硬骨鱼类生理盐水+1%胎牛血清)的胚胎发育状况最差,在发育至眼囊出现期时,发育速率明显减慢,致使整个胚胎发育时间延长。

初始胚胎处于晶体出现期的培养结果 经过连续观察,当初始胚胎为晶体出现期时,在胚胎发育的速率上,添加了许氏平鲷血清的第二组(海水硬骨鱼类生理盐水+1%许氏平鲷血清)和第五组(海水硬骨鱼类生理盐水+1%许氏平鲷血清+1%卵巢组织匀浆)发育最快。最终的胚胎孵出率为第五组最高,第一组(海水硬骨鱼类生理盐水)次之(表5)。

3 讨论

根据本实验的观察结果,结合其他鱼类相关研究^[16-17],可以将许氏平鲷的胚胎发育过程划分为卵裂期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期、早期器官形成期、心跳期、肌肉效应期和孵化期。本次实验观察了许氏平鲷胚胎发育的27个具体发育时期(未包括32细胞期之前的发育过程),并且描述了各个时期胚胎发育的形态特征和时间节点。观察结果表明,卵裂属于盘状卵裂,胚胎发育规律与大多数海水硬骨鱼类基本相似,在胚胎发育的后期,胚胎眼球有黑色素出现,并且眼球颜色逐渐加深,这与大多数海水硬骨鱼类不同,但接近于褐菖鲈及亲缘关系较近的大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*)等^[13]。以往学者对许氏平鲷的群体繁殖生物学有比较深入的研究^[2-10],但仍没有文献指出许氏平鲷妊娠期的持续时间。虽然不能在体外培养的条件下完成一

表3 许氏平鲉胚胎的发育时序及发育特征

Tab. 3 Stages and characteristics of embryonic development in *S. schlegelii*

发育时期 developmental stages	发育持续时间 developmental duration	胚胎发育主要特征 main characteristics of embryonic development
32细胞期	56 min	胚盘进行第5次分裂, 形成32个分裂球, 排列整齐
64细胞期	1 h 50 min	胚盘进行第6次分裂, 形成64个大小不一的分裂球
多细胞期	2 h 40 min	细胞变得细小并开始重叠
桑椹胚期	2 h 38 min	胚盘经多次经裂和纬裂, 细胞变得更小, 变成多层细胞球
高囊胚期	2 h 25 min	囊胚高而集中, 呈高帽状
囊胚中期	2 h 12 min	囊胚高度降低, 细胞层相对变薄
囊胚晚期	2 h 45 min	囊胚边缘变薄, 细胞层渐渐沿卵黄囊向扁平发展
原肠胚早期	4 h 56 min	背面可见胚环, 侧面可见胚盾已形成, 胚层下包卵黄约1/4
原肠胚中期	5 h 30 min	胚盘向植物极运动, 胚层下包卵黄约1/2
原肠胚晚期	5 h 55 min	胚层下包卵黄约1/2, 可分为上下胚层
胚体出现期	6 h 10 min	胚体已轮廓清晰
神经胚期	6 h 20 min	成神经管, 体节2对
眼囊出现期	6 h 40 min	头部开始分化, 两侧出现眼囊
四肌节期	2 h 20 min	肌节4对
六肌节期	6 h 50 min	肌节6对
十肌节期	6 h 30 min	肌节10对
十二肌节期	8 h 30 min	肌节12对
十六肌节期	8 h 40 min	肌节16对
听囊期	8 h 20 min	眼囊后方出现一对点状的听囊
尾芽期	10 h 50 min	在胚体后端伸出圆锥状尾芽
心跳期	14 h 30 min	心脏开始跳动, 起始时每分钟2~3次
晶体出现期	16 h 20 min	晶体轮廓清晰, 胚体开始扭动
耳石形成期	12 h 30 min	头部后方出现两颗点状的耳石
肌肉效应期	14 h	胚体无规则颤动明显加快
心脏发育期	18 h 20 min	心率显著增加, 达到每分钟50~60次
将孵期	23 h 40 min	胚体的抽动更频繁、有力
孵化期	17 h 30 min	胚体扭动剧烈, 尾部率先破膜而出

注: 各个发育阶段的英文对照见图版的批注, 下同

Notes: the corresponding translation of every developmental stage can be found in the note of plate, the same below

次从受精卵至破膜的完整的胚胎发育, 只能分别选取不同发育期的胚胎进行体外培养, 记录每期的发育时长, 累加得到总的时长, 可以间接推测许氏平鲉整个妊娠期的持续时间, 本研究探明许氏平鲉受精卵发育至破膜大约需200 h。由于体外培养不能完全复制体内发育的条件, 所以此结果只是推测得出妊娠许氏平鲉的胚胎发育时长。陈大刚等^[4]在群体繁殖生物学研究基础上, 得出许氏平鲉怀仔期约1个月, 这与体外培养得出的结果有很大差别, 由此可知, 体外培养可以缩短许氏平鲉固有的妊娠期, 但是却得不

到健康的初孵仔鱼, 这表明模拟雌鱼卵巢内的发育环境是十分困难的。

由于工作量大, 所以每组培养液没有设重复, 结果也没有进行单因素方差分析, 可能导致推断不够精确, 但从直观上观测许氏平鲉胚胎在不同的培养液中, 其发育速率、发育状态、每期的发育时长和存活时间有很大的区别。在5组不同的培养液中, 第五组培养液的胚胎发育速率和孵化率分别是最快和最高的, 而第四组相对较慢, 因为没有完成一次完整的胚胎发育, 根据以上结果还不足以准确得出第五组培

表 4 初始胚胎处于高囊胚期的离体培养结果

Tab. 4 The result of initial embryos which are in high blastula stage *in vitro* culture

时间 time	第一组 first group	时间 time	第二组 second group	时间 time	第三组 third group	时间 Time	第四组 fourth group	时间 time	第五组 fifth group
0 h	高囊胚期	0 h	高囊胚期	0 h	高囊胚期	0 h	高囊胚期	0 h	高囊胚期
2 h	囊胚中期	2 h	囊胚中期	2 h	囊胚中期	4 h	囊胚晚期	4 h	囊胚晚期
4 h	囊胚晚期	8 h	囊胚晚期	8 h	囊胚晚期	8 h	原肠胚期	8 h	原肠胚期
8 h	原肠胚期	10 h	原肠胚期	10 h	原肠胚期	16 h	胚体出现期	14 h	胚体出现期
10 h	胚体出现期	18 h	胚体出现期	12 h	原肠胚晚期	32 h	眼囊出现期	26 h	神经胚期
28 h	神经胚期	32 h	神经胚期	24 h	胚体出现期	46 h	四肌节期	32 h	眼囊出现期
30 h	眼囊出现期	40 h	眼囊出现期	38 h	神经胚期	52 h	六肌节期	40 h	四肌节期
40 h	四肌节期	42 h	四肌节期	42 h	四肌节期	57 h	十肌节期	43 h	六肌节期
42 h	六肌节期	48 h	六肌节期	48 h	六肌节期	59 h	十二肌节期	48 h	十肌节期
50 h	十肌节期	55 h	十肌节期	50 h	十肌节期	67 h	十六肌节期	51 h	十二肌节期
55 h	十二肌节期	59 h	十二肌节期	57 h	十二肌节期			60 h	十六肌节期
62 h	十六肌节期	66 h	十六肌节期	62 h	十六肌节期				

表 5 初始胚胎处于晶体出现期的培养结果

Tab. 5 The result of initial embryos which are in crystal stage *in vitro* culture

发育阶段 the duration of development	发育时间 time				
	第一组 first group	第二组 second group	第三组 third group	第四组 fourth group	第五组 fifth group
晶体出现期	0 h	0 h	0 h	0 h	0 h
肌肉效应期	12 h	14 h	16 h	16 h	10 h
耳石形成期	25 h	27 h	29 h	30 h	23 h
心脏发育期	33 h	31 h	35 h	36 h	32 h
将孵期	47 h	37 h	45 h	44 h	35 h
孵化期	53 h	40 h	53 h	51 h	38 h
大量初孵时间	90 h	60 h	77 h	75 h	57 h
孵化率 hatching rate	70%	40%	60%	60%	80%

养液就是最适合的培养液, 发育最快的不一定是发育最好的, 但可推断出血清和卵巢组织匀浆中存在某种因子影响胚胎的发育速率和存活。尽管胎牛血清是哺乳动物胚胎、组织、细胞体外培养不可或缺的添加物, 而且其制备在国外已形成商业化规模; 尽管在孔雀花鳞的体外培养中表明, 在基础培养液基础上添加10%的胎牛血清是最适培养液^[14], 但在本研究中, 添加胎牛血清的培养液中早期胚胎发育整体状况较差, 表明胎牛血清可能不宜做许氏平鲉早期胚胎体外培养液的添加物, 可能与鱼类物种不同有关。

本研究表明, 许氏平鲉受精卵和胚胎在离体条件下可以存活, 进一步证明了许氏平鲉发育在破膜前与母体没有营养关系, 但是却不能成功地在体外完成一个完整的胚胎发育。在本研究中, 当体外培养初始发育阶段为高囊胚期时, 5种不同的培养液都能使胚胎发育到十六肌节期, 但之后全部死亡; 体外培养阶段为晶体出现期时, 5种不同的培养液也都能使胚胎发育至出膜, 但破膜之后的仔鱼在一天中全部死亡。Martyn等^[11]对孔雀花鳞的胚胎进行了体外培养实验, 并进行了连续的观察, 胚胎存活时间达到了4周; 林丹军等^[13]也对褐菖鲉的胚胎体外培养进行了研究, 但这两次实验都没有完成发育的全过程。本研究在培养过程中跟踪记录了培养液的盐度和pH的变化, 发现在72 h后, 盐度从22上升到28, 而pH稳定在7.5左右, 这表明渗透压的升高可能是死亡原因, 因为胚胎死亡时通体发黑, 具明显的渗透失水状。盐度升高可能是由于培养液更换周期比较长所致。Haas-Andela^[18]认为卵黄囊能否被吸收是影响胚胎存活的重要因素, 在此实验中, 破膜后的仔鱼不能存活, 可能是因为不能吸收卵黄囊, 正常情况下, 破膜仔鱼还要在母体发育一段时间, 直至卵黄囊吸收到一定程度才产出。而Lindeman等^[19]在对斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎的研究中提出, 在受精卵向胚胎的发育过程中, 受精卵中原来母体留下的RNA和一些蛋白质被激活, 指导胚胎的细胞分化过程。可以从分子生物学角度推测, 在体外培养的胚胎早期发育中, 受精卵中原来存在

的母体赋予的RNA和蛋白质不能够正常引导胚胎的分化,导致早期胚胎在培养液中存活时间短,不能正常发育到胚胎晚期。

虽然本实验对许氏平鲈的体外培养发育形态学进行了研究,也探讨了培养液添加物的适宜比例,并得出了一些初步结果,但仍没有在体外培养的条件下,成功完成一次完整的从受精卵至破膜的发育史。要研发适合许氏平鲈胚胎发育的体外培养液,还需要从探究妊娠期卵巢内部环境入手,比如研究卵巢组织液的成分、受精卵及胚胎在卵巢内所受到的压强等因素。同时利用分子生物学手段,查明卵巢中的胚胎与母体有无联系,并找到控制此过程的关键基因。

参考文献:

- [1] 冯昭信. 鱼类学[M]. 第2版. 北京: 中国农业出版社, 2003: 191.
Feng Z X. Ichthyology[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2003: 191 (in Chinese).
- [2] 冯东岳. 许氏平鲈繁殖生物学及人工养殖技术的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2003.
Feng D Y. The research of propagation biology and artificial culture technology on *Sebastes schlegeli* Hilgendorf[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2003 (in Chinese).
- [3] 万景瑞, 陈瑞盛. 黑鲷的生殖习性及其早期形态[J]. 海洋水产研究, 1988(9): 213-220.
Wan J R, Chen R S. Reproductive behavior and morphology of early development of *Sebastes fuscescens* (Houttuyn) in the Bohai sea[J]. Marine Fisheries Research, 1988(9): 213-220 (in Chinese).
- [4] 陈大刚, 叶振江, 段钰, 等. 许氏平鲈繁殖群体的生物学及其苗种培育的初步研究[J]. 海洋学报, 1994, 16(3): 94-101.
Chen D G, Ye Z J, Duan Y, et al. The preliminary research of the biology of propagation group and the technology of larval rearing on *Sebastes schlegeli* Hilgendorf[J]. Acta Oceanologica Sinica, 1994, 16(3): 94-101 (in Chinese).
- [5] 朱龙, 隋风美. 许氏平鲈的生物学特征及其人工养殖[J]. 现代渔业信息, 1999, 14(4): 21-25.
Zhu L, Sui F M. Biology and artificial culture of *Sebastes schlegeli* hilgendorf[J]. Modern Fisheries Information, 1999, 14(4): 21-25 (in Chinese).
- [6] 史丹, 温海深, 杨艳平. 许氏平鲈卵巢发育的周年变化研究[J]. 中国海洋大学学报, 2011, 41(9): 25-30.
Shi D, Wen H S, Yang Y P. The annual change of ovarian development in female *Sebastes schlegeli*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2011, 41(9): 25-30 (in Chinese).
- [7] 杨艳平, 温海深, 史丹, 等. 许氏平鲈(*Sebastes schlegeli*) *CYP19B*基因cDNA克隆及在生殖周期中的表达分析[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(2): 370-375.
Yang Y P, Wen H S, Shi D, et al. Cloning and the expression analysis of *CYP 19B* gene cDNA during the reproductive cycle of *Sebastes schlegeli*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(2): 370-375 (in Chinese).
- [8] Shi D, Wen H S, He F, et al. The physiology functions of estrogen receptor α (ER α) in reproduction cycle of ovoviviparous black rockfish, *Sebastes schlegeli* Hilgendorf[J]. Steroids, 2011, 76(14): 1597-1608.
- [9] Mu W J, Wen H S, He F, et al. Cloning and expression analysis of the cytochrome P450c17s enzymes during the reproductive cycle in ovoviviparous Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*)[J]. Gene, 2013, 512(2): 444-449.
- [10] 韩佳寅, 梁爱华. 全胚胎培养技术及其应用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(5): 549-553.
Han J Y, Liang A H. Research progress of whole embryo culture tool and its application[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2010, 35(5): 549-553 (in Chinese).
- [11] Martyn U, Weigel D, Dreyer C. *In vitro* culture of embryos of the guppy, *Poecilia reticulata*[J]. Developmental Dynamics, 2006, 235(3): 617-622.
- [12] Koya Y, Inoue M, Naruse T, et al. Dynamics of oocyte and embryonic development during ovarian cycle of the viviparous mosquitofish *Gambusia affinis*[J]. Fisheries Science, 2000, 66(1): 63-70.
- [13] 林丹军, 尤永隆. 卵胎生硬骨鱼褐菖鲈胚胎及仔鱼的发育[J]. 台湾海峡, 2002, 21(1): 45-52.
Lin D J, You Y L. Embryonic and larval development of ovoviviparous teleost, *Sebastes marmoratus*[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2002, 21(1): 45-52 (in Chinese).
- [14] Liu L L, Lee K Y. Studies of *in vitro* embryo culture of guppy (*Poecilia reticulata*)[J]. Development and Reproduction, 2014, 18(3): 139-143.
- [15] 楼允东. 介绍一种适用于海水硬骨鱼类的生理盐水[J].

- 动物学杂志, 1978, 1: 41.
- Lou Y D. Introduction to a formulation of saline which is suitable to marine teleost [J]. Chinese Journal of Zoology, 1978, 1: 41(in Chinese).
- [16] Falk-Petersen I B. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 19(5): 397-412.
- [17] Haynes J L. Standardized classification of Poeciliid development for life-history studies[J]. Copeia, 1995, 1995(1): 147-154.
- [18] Haas-Andela H. *In vitro* culture of embryos of the Xiphophorine fish and their raising to adulthood[J]. Zoologischer Anzeiger, 1976, 197: 1-5.
- [19] Lindeman R E, Pelegri F. Vertebrate maternal-effect genes: insights into fertilization, early cleavage divisions, and germ cell determinant localization from studies in the zebrafish[J]. Molecular Reproduction and Development, 2010, 77(4): 299-313.

The developmental morphology of ovoviviparous *Sebastes schlegeli* in vitro culture

ZHAO Ji, FENG Qichao, WEN Haishen*

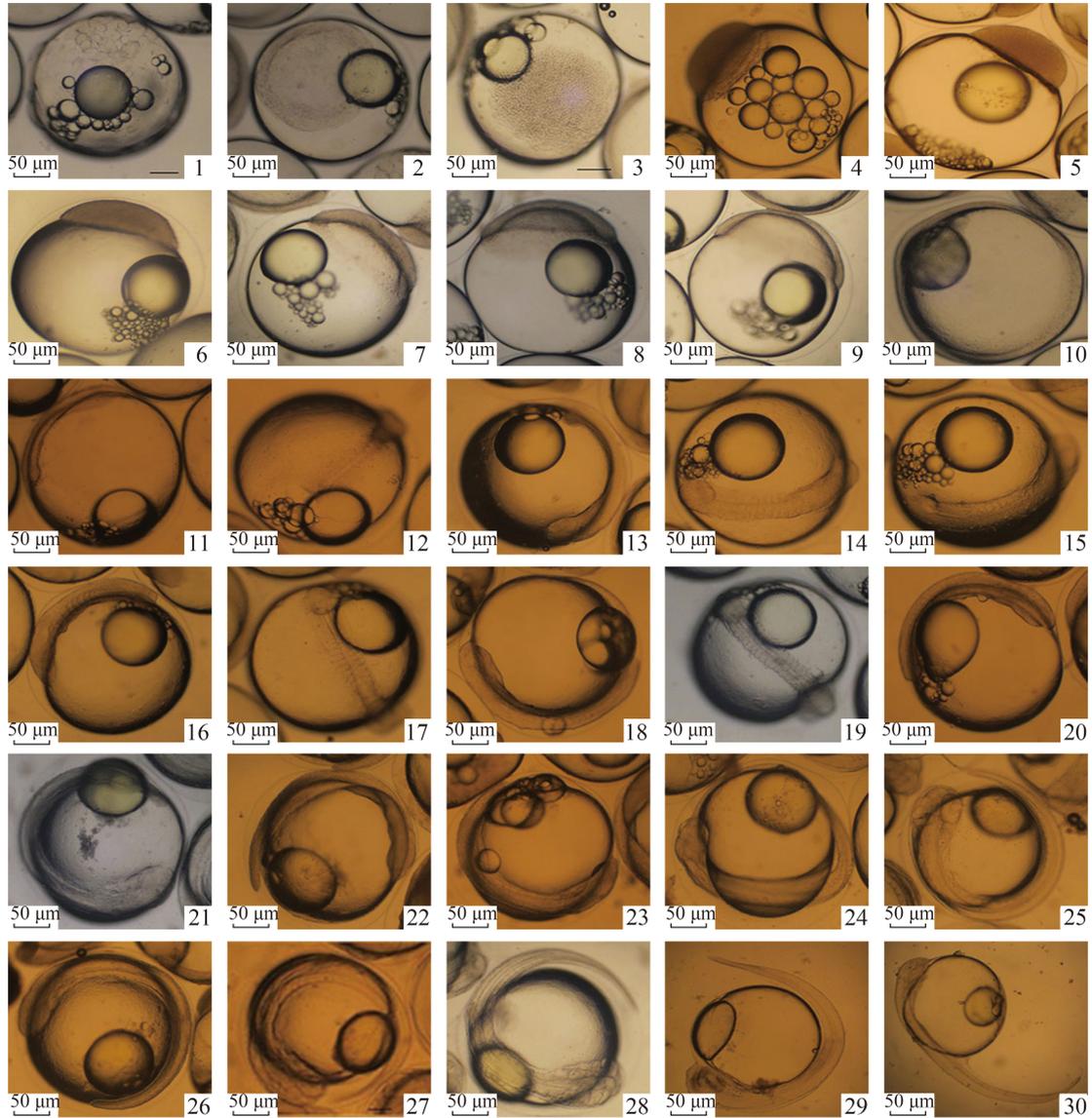
(College of Fishery, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In order to explore the developmental embryo morphology *in vitro* culture and design the most optimal embryo medium for *Sebastes schlegeli*, physiological saline as the main formula set as control group (first group) was respectively supplemented with 1% serum of *S. schlegeli* (second group), 1% homogenate of ovarian tissue of *S. schlegeli* (third group), 1% fetal bovine serum (fourth group), 1% serum of *S. schlegeli* and 1% homogenate of ovarian tissue of *S. schlegeli* (fifth group), which formed into five different media. High blastocyst stage and crystal stage were respectively set as the original embryonic phase, and then were placed in the above five different media. According to the observation and records, present study found that when the original embryonic stage was high blastocyst stage, although embryo in every group can develop to 16-sarcomere stage, developmental speed and duration greatly varied. The fifth group displayed fastest developmental speed for 60 h, the fourth groups show the worst performance for 67 h and the speeds of the rest of the groups were between the fourth group and fifth group; when the initial stage was crystal phase, the fifth had the fastest speed for 57 h and the highest hatching rate at 80%. The second possessed identical speed, but had lowest hatching ability for 40%. Research showed that, under the *in vitro* culture condition, it needed about 200 h to make fertilized eggs develop to newly hatched larvae and it was the fifth embryonic medium that made the embryo have fastest developmental speed in *S. schlegeli*.

Key words: *Sebastes schlegeli*; embryonic development; *in vitro* culture; embryonic medium

Corresponding author: WEN Haishen. E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

Funding projects: Natural Science Foundation of China (41476110)



图版 许氏平鲉胚胎发育过程

1. 32细胞期; 2. 64细胞期; 3. 多细胞期; 4. 桑椹胚期; 5. 高囊胚期; 6. 囊胚中期; 7. 囊胚晚期; 8. 原肠胚早期; 9. 原肠胚中期; 10. 原肠胚晚期; 11. 胚体出现期; 12. 神经胚期; 13. 眼囊出现期; 14. 四肌节期; 15. 六肌节期; 16. 十肌节期; 17. 十肌节期(正面); 18. 十二肌节期; 19. 十六肌节期; 20. 十六肌节期(侧面); 21. 听囊期; 22. 尾芽期; 23. 心跳期; 24. 晶体出现期; 25. 耳石出现期; 26. 肌肉效应期; 27. 心脏发育期; 28. 将孵期; 29. 孵化期; 30. 初孵仔鱼

Plate Embryonic development of *S. schlegeli*

1. 32-cell stage; 2. 64-cell stages; 3. multi-cell stage; 4. morula stage; 5. high blastula stage; 6. middle blastula-stage; 7. late blastula stage; 8. early gastrula stage; 9. middle gastrula stage; 10. late gastrula stage; 11. embryo body stage; 12. neurulation stage; 13. optic vesicle stage; 14. 4-sarcomere stage; 15. 6-sarcomere stage; 16. 10-sarcomere stage; 17. 10-sarcomere stage(positive); 18. 12-sarcomere stage; 19. 16-sarcomere stage; 20. 16-sarcomere stage(side); 21. otic vesicle stage; 22. ail-bud stage; 23. heart-beating stage; 24. crystal stage; 25. otolith appearance stage; 26. embryo movement stage; 27. heart development stage; 28. pre-hatching stage; 29. hatching stage; 30. newly hatched larvae